



DEMANDE INTERNATIONALE PUBLIÉE EN VERTU DU TRAITE DE COOPERATION EN MATIÈRE DE BREVETS (PCT)

(51) Classification internationale des brevets ⁶ : A61K 47/48	A1	(11) Numéro de publication internationale: WO 97/02840 (43) Date de publication internationale: 30 janvier 1997 (30.01.97)
(21) Numéro de la demande internationale: PCT/FR96/01076 (22) Date de dépôt international: 10 juillet 1996 (10.07.96) (30) Données relatives à la priorité: 95/08316 10 juillet 1995 (10.07.95) FR (71) Déposants (pour tous les Etats désignés sauf US): INSTITUT PASTEUR [FR/FR]; 25-28, rue du Dr.-Roux, F-75724 Paris Cédex 15 (FR). UNIVERSITE PIERRE ET MARIE CURIE (PARIS VI) [FR/FR]; 4, place Jussieu, F-75252 Paris Cédex 06 (FR). (72) Inventeurs; et (75) Inventeurs/Déposants (US seulement): AVRAMEAS, Stratis [FR/FR]; 1, rue Sarasate, F-75015 Paris (FR). BUTTIN, Gérard [FR/FR]; 63, rue Croulebarbe, F-75013 Paris (FR). TERNYNCK, Thérèse [FR/FR]; 39, boulevard Garibaldi, F-75015 Paris (FR). NATO, Faridabano [FR/FR]; 65, rue Mirabeau, F-92160 Antony (FR). (74) Mandataires: GUTMAN, Ernest etc.; Ernest Gutmann-Yves Plasseraud S.A., 3, rue Chauveau-Lagarde, F-75008 Paris (FR).		(81) Etats désignés: CA, JP, US, brevet européen (AT, BE, CH, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE). Publiée <i>Avec rapport de recherche internationale.</i> <i>Avant l'expiration du délai prévu pour la modification des revendications, sera republiée si de telles modifications sont reçues.</i>

(54) Title: IMMUNOVECTORS FOR THE INTRACELLULAR AND INTRANUCLEAR TRANSPORT**(54) Titre:** IMMUNOVECTEURS UTILISABLES POUR LE TRANSPORT INTRACELLULAIRE ET INTRANUCLEAIRE**(57) Abstract**

A product for coupling a biologically active principle with an immunovector, characterised in that the immunovector is capable of enabling the biologically active principle to be internalised into eukaryotic cells, and in that said immunovector has an affinity for the cell DNA to such an extent that it can transfer the biologically active principle into or to the immediate vicinity of the cell nuclei.

(57) Abrégé

L'invention concerne un produit de couplage entre un principe biologiquement actif et un immunovecteur caractérisé à la fois par la capacité de l'immunovecteur à permettre l'internalisation dans des cellules eucaryotes du principe biologiquement actif, et par l'affinité de l'immunovecteur pour l'ADN de ces cellules, au point de le rendre apte à transférer le principe biologiquement actif à proximité immédiate des noyaux de ces cellules ou dans ces noyaux.

UNIQUEMENT A TITRE D'INFORMATION

Codes utilisés pour identifier les Etats parties au PCT, sur les pages de couverture des brochures publiant des demandes internationales en vertu du PCT.

AT	Arménie	GB	Royaume-Uni	MW	Malawi
AT	Autriche	GE	Géorgie	MX	Mexique
AU	Australie	GN	Guinée	NE	Niger
BB	Barbade	GR	Grèce	NL	Pays-Bas
BE	Belgique	HU	Hongrie	NO	Norvège
BF	Burkina Faso	IE	Irlande	NZ	Nouvelle-Zélande
BG	Bulgarie	IT	Italie	PL	Pologne
BJ	Bénin	JP	Japon	PT	Portugal
BR	Brésil	KE	Kenya	RO	Roumanie
BY	Bélarus	KG	Kirghizistan	RU	Fédération de Russie
CA	Canada	KP	République populaire démocratique de Corée	SD	Soudan
CF	République centrafricaine	KR	République de Corée	SE	Suède
CG	Congo	KZ	Kazakhstan	SG	Singapour
CH	Suisse	LI	Liechtenstein	SI	Slovénie
CI	Côte d'Ivoire	LK	Sri Lanka	SK	Slovaquie
CM	Cameroon	LR	Libéria	SN	Sénégal
CN	Chine	LT	Lituanie	SZ	Swaziland
CS	Tchécoslovaquie	LU	Luxembourg	TD	Tchad
CZ	République tchèque	LV	Lettonie	TG	Togo
DE	Allemagne	MC	Monaco	TJ	Tadjikistan
DK	Danemark	MD	République de Moldova	TT	Trinité-et-Tobago
EE	Estonie	MG	Madagascar	UA	Ukraine
ES	Espagne	ML	Mali	UG	Ouganda
FI	Finlande	MN	Mongolie	US	Etats-Unis d'Amérique
FR	France	MR	Mauritanie	UZ	Ouzbékistan
GA	Gabon			VN	Viet Nam

IMMUNOVECTEURS UTILISABLES POUR LE TRANSPORT INTRACELLULAIRE ET INTRA-NUCLEAIRE

5

La présente invention est relative au transfert actif d'haptènes, de protéines, d'acides nucléiques et autres molécules dans le noyau de
10 cellules eucaryotes. Cette invention revêt une importance majeure puisqu'elle peut être appliquée à divers domaines, notamment celui de la thérapie génique et des vaccins.

La thérapie génique demeure conditionnée par un nombre considérable de
15 paramètres, parmi lesquels le développement de vecteurs capables de transporter à travers le cytoplasme de ces cellules de l'organisme de l'hôte des principes actifs doués de propriétés spécifiques prédéterminées dans les noyaux de cellules de l'organisme en l'absence d'altérations génétiques associées à l'utilisation de ces vecteurs, et la non-dégradation de l'activité
20 biologique des principes actifs transférés. On sait qu'à ce jour toutes ces conditions sont loin d'être réunies (1).

En effet, les méthodes actuelles utilisées couramment pour transférer l'ADN dans les cellules sont les suivantes : des méthodes générales, non
25 sélectives, qui utilisent la propriété de l'ADN de coprécipiter avec le phosphate de calcium ou le DEAE-dextran, ou bien l'introduction directe de l'ADN dans les cellules sous l'effet d'un champ électrique (électroporation). Ces méthodes sont très toxiques pour les cellules, entraînant une grande mortalité et une grande variabilité selon les cellules utilisées. D'autres
30 méthodes utilisent un ciblage de l'entrée du gène dans les cellules par des

récepteurs présents à leur membrane. L'ADN peut alors pénétrer dans la cellule par l'intermédiaire soit d'un ligand spécifique de ces récepteurs : asialorosomucoïde (2), insuline (3) ou transferrine (4), soit d'anticorps spécifiques de constituants membranaires (5). Le complexe ADN/ligand
5 pénètre dans la cellule par un processus d'endocytose. La transfection est donc limitée par une destruction importante du complexe dans les vésicules lysosomales, et différentes méthodes ont été proposées pour pallier ces inconvénients, notamment le blocage du compartiment lysosomal par la chloroquine ou l'addition simultanée d'adénovirus qui
10 échappent au compartiment endosomal en détruisant la membrane des vésicules d'endocytose (6).

La présente invention a pour but de mettre à disposition un nouveau type de vecteurs à la fois plus efficaces et d'une plus grande innocuité que les
15 vecteurs viraux dont l'utilisation est envisagée à ce jour.

L'invention concerne donc un produit de couplage entre un principe biologiquement actif et un de ces nouveaux vecteurs, ci-après dénommés "immunovecteurs", ledit produit de couplage étant caractérisé, à la fois par
20 la capacité de l'immunovecteur à permettre l'internalisation dans des cellules eucaryotes de principes biologiquement actifs liés de manière covalente ou non covalente à ces immunovecteurs, et par leur affinité pour l'ADN de ces cellules, au point de rendre ledit immunovecteur apte à transférer le principe biologiquement actif à proximité immédiate des
25 noyaux de ces cellules ou dans les noyaux de ces cellules.

Ces immunovecteurs consistent de préférence en des anticorps ou fragments d'anticorps aptes à reconnaître des séquences d'ADN au sein de ces cellules, et auxquels peuvent être liés de manière covalente ou non
30 covalente des principes biologiquement actifs, ces anticorps ou fragments d'anticorps étant en outre capables de transporter in vitro et in vivo ces

principes biologiquement actifs à travers les membranes et le cytoplasme de ces cellules, et à les transférer à proximité ou même dans le noyau de ces cellules.

- 5 Il est entendu que dans la présente description le terme "principe biologiquement actif" concerne toute molécule, macromolécule, groupe de molécules possédant l'activité biologique du genre en question.

10 L'invention est également relative à un procédé de transfert, notamment d'haptènes, de protéines et/ou d'acides nucléiques dans le noyau de cellules particulièrement de cellules eucaryotes, ce procédé étant basé sur l'utilisation des propriétés desdits immunovecteurs.

15 L'existence d'anticorps capables de pénétrer à l'intérieur de noyaux de lymphocytes humains lorsque ces cellules sont incubées in vitro dans un milieu de culture contenant un sérum provenant de malades atteints de lupus érythémateux disséminé (LED), a été rapportée pour la première fois par Alarcon-Segovia et al. en 1978 (7). Par la suite, la même équipe a démontré que ces anticorps sont d'isotype IgG et sont capables de réagir
20 avec des acides ribonucléiques, libres ou complexés avec des protéines (8). Récemment, ce type d'anticorps a été détecté chez la souris lupique MRL lpr/lpr, mais également chez la souris NZB présentant un syndrome de maladie hémolytique auto-immune et même chez la souris normale BALB/c. Certains anticorps monoclonaux, préparés à partir de la rate de
25 ces souris, se sont avérés capables de pénétrer in vitro dans le noyau de cellules maintenues en culture (10-13). Comme chez l'humain, il a été noté que ces anticorps monoclonaux étaient capables de reconnaître des acides nucléiques. De plus, il a été montré que ces anticorps sont aussi capables, lorsqu'ils sont injectés chez la souris, de pénétrer dans plusieurs
30 types de cellules, pour se retrouver dans leurs noyaux (11).

L'invention découle de la découverte que ce type d'anticorps ou des fragments de ces anticorps pouvaient aussi être utilisés comme vecteurs, ci-après « immunovecteurs » aptes à transporter des principes biologiquement actifs, tels que des haptènes, des protéines, et des acides nucléiques à travers les membranes et le cytoplasme des cellules correspondantes, et à assurer leur transfert dans le noyau desdites cellules.

Ces anticorps peuvent être obtenus sous forme polyclonale à partir d'un sérum, en particulier d'un animal préalablement immunisé contre des fragments d'acide nucléique porteurs de l'épitope correspondant, ou sous forme monoclonale, à partir d'hybridomes sécréteurs de tels anticorps.

Tout type de liaison, chimique ou non, peut être mise en oeuvre pour assurer le couplage d'un immunovecteur du type anticorps ou fragment d'anticorps ayant une affinité pour les acides nucléiques au principe biologiquement actif, par exemple un haptène ou un acide nucléique, aux fins de le transporter à travers les membranes et le cytoplasme des cellules, et à assurer le transfert de ces principes actifs dans le noyau.

De façon préférée l'on aura recours à un mode de couplage chimique, permettant la réalisation de liaisons covalentes ou non covalentes.

Des produits de couplage préférés sont ceux dont les immunovecteurs sont sélectionnables par un test de pénétration cellulaire comportant une première incubation de l'immunovecteur étudié en présence de cellules en culture dans le noyau desquelles le principe actif susceptible d'être associé à l'immunovecteur doit être transporté, suivie, après fixation et perméabilisation de ces cellules, d'une autre incubation avec des anticorps anti-immunovecteurs marqués, et enfin d'une détection à proximité immédiate du noyau ou même au sein de celui-ci de la réaction

immunologique du type antigène-anticorps entre l'immunovecteur et l'anticorps anti-immunovecteur.

Parmi les immunovecteurs préférés de la présente invention, on
5 mentionnera les anticorps ayant une affinité pour un acide nucléique, ou un fragment de ceux-ci, ce dernier conservant cette affinité.

Les anticorps ayant également la capacité de se fixer sur les cellules, en particulier des cellules lymphoïdes sont également utilisables. Cette
10 dernière catégorie d'immunovecteurs peut également être sélectionnée par un test, lequel peut alors aussi comprendre l'incubation des immunovecteurs à l'étude avec des cellules lymphoïdes, le lavage desdites cellules lymphoïdes, l'incubation de ces dernières avec des anticorps anti-immunovecteurs marqués, et la détermination du nombre de cellules
15 positives dans chaque population.

Dans une réalisation, les cellules lymphoïdes utilisées sont des splénocytes de souris auto-immunes présentant un syndrome lupique.

20 Un immunovecteur préféré pour le produit de couplage est choisi parmi les IgG monoclonales, les fragments (Fab')₂ ou (Fab'), ou tous polypeptides correspondant au(x) site(s) des anticorps impliqué(s) dans la reconnaissance de l'acide nucléique correspondant.

25 Préférentiellement, cet immunovecteur est une immunoglobuline, plus particulièrement une IgG portant une activité anti-ADN, et provenant d'individus normaux.

En outre, cet immunovecteur peut être une IgG portant une activité anti-
30 ADN, et provenant d'individus présentant des syndromes auto-immuns, plus particulièrement des syndromes de lupus érythémateux disséminé.

Dans une réalisation particulière de l'invention, l'immunovecteur couplé au principe actif est un anticorps bi-spécifique reconnaissant d'une part l'ADN, et d'autre part une protéine telle que Tat, Rev du rétrovirus VIH, ainsi que des marqueurs de surface tels que CD3, CD4, CD8, CD19, et CD34.

5

Préférentiellement, le principe biologiquement actif couplé à l'immunovecteur est une molécule choisie parmi notamment des acides nucléiques, des protéines notamment les enzymes, par exemple la peroxydase, des haptènes notamment la biotine ou la fluorescéine, les

10

Dans une réalisation préférée, l'acide nucléique couplé est un polynucléotide, l'immunovecteur étant une IgG, le couplage s'effectuant par l'intermédiaire de la p-benzoquinone à raison d'une molécule

15

Un principe biologiquement actif utilisé de préférence, est constitué par un plasmide destiné à s'intégrer dans le noyau des cellules cibles pour l'expression d'une protéine codée par un gène contenu dans ledit

20

En effet, la polylysine, qui par ses propriétés cationiques est capable de compacter l'ADN, favorise la transfection des cellules. Le couplage de polylysine à l'immunovecteur, qui s'effectue à l'aide d'un agent de couplage, plus particulièrement un carbodiimide tel que l'EDC (1-(3-diméthylaminopropyl)-1'-éthyl carbodiimide), permet à l'ADN de réagir

30

avec celle-ci. Cela a pour effet d'induire la libération du site actif de

l'anticorps qui peut être parfois masqué lorsque l'anticorps est couplé à un principe actif de la taille d'un plasmide.

5 D'autres agents susceptibles d'avoir, grâce à leurs propriétés cationiques, un effet de compactage sur l'ADN (2-6), peuvent aussi être couplés à l'immunovecteur pour remplir une telle fonction.

De manière plus spécifique, un principe biologiquement actif utilisé préférentiellement est constitué par un gène destiné à s'intégrer dans le
10 génome des cellules cibles, notamment par recombinaison homologue, plus particulièrement un ADN "nu" contenant une séquence d'acide nucléique codant pour un polypeptide originaire de cellules bactériennes ou eucaryotes, de cellules fongiques, ou de virus, ce polypeptide ayant des propriétés vaccinales.

15 Avantageusement, ce principe actif permet l'immortalisation de types cellulaires choisis, particulièrement les macrophages, les cellules dendritiques, les cellules B et T, et les cellules hématopoïétiques, notamment d'origine humaine.

20 De façon encore préférée, ce principe biologiquement actif est un oligonucléotide antisens permettant l'inhibition de la synthèse protéique ou nucléotidique, par exemple dans les cellules infectables par un rétrovirus VIH, ou dans des cellules tumorales.

25 Ainsi, les inventeurs ont d'une part tenté d'obtenir à partir de la rate de souris autoimmunes (NZB x NZW)F1, présentant un syndrome lupique, des anticorps monoclonaux IgG qui ont été sélectionnés pour leur capacité à réagir avec l'ADN mais aussi, pour leur capacité à pénétrer jusqu'au
30 noyau des cellules. Parallèlement, des anticorps polyclonaux réagissant avec l'ADN et pouvant pénétrer dans les noyaux des cellules ont été isolés

par chromatographie d'affinité. Cette chromatographie a été appliquée, soit à un "pool" de sérums de patients normaux ou à un sérum individuel normal, et de préférence à des sérums provenant de patients atteints d'infections, particulièrement à un sérum de patients normaux atteints de
5 LED, soit à un sérum de souris (NZB x NZW)F1.

Dans un procédé de sélection d'immunovecteurs selon la présente invention, le test de pénétration cellulaire des immunovecteurs comprend une première incubation de lignées cellulaires eucaryotes dans un milieu
10 contenant lesdits immunovecteurs de préférence en concentration croissante, puis la fixation et, si besoin, la perméabilisation, ou vice-versa, de ces cellules, suivie d'une incubation desdites lignées cellulaires avec des anticorps anti-immunovecteurs marqués de préférence à la fluorescéine ou à la peroxydase, et la localisation des anticorps ainsi
15 marqués à proximité des noyaux desdites cellules ou mieux encore à l'intérieur des noyaux. Les lignées cellulaires sont notamment choisies parmi les fibroblastes, les thymocytes ou les splénocytes.

Sans que les conditions réactionnelles qui suivent aient un caractère
20 limitatif, il peut-être mentionné que la première incubation est souvent effectuée à 37°C, durant environ 2 à 8 heures avec des concentrations d'immunovecteurs d'environ 1 à 70 µg/ml, sur des lignées cellulairesensemencées à une concentration allant de 5×10^3 à 5×10^6 cellules par millilitre.

25

Dans une des réalisations du procédé, la lignée cellulaire est une lignée fibroblastique en croissance exponentielleensemencée à une concentration de 2×10^4 cellules par millilitre, ou des thymocytes ou des splénocytes de souris BALB/c lesquels sont mis en suspension à raison
30 d'environ 10^6 cellules par millilitre.

Par ailleurs, l'invention concerne un procédé de préparation de produit de couplage immunovecteur-molécule(s), les immunovecteurs étant choisis parmi les anticorps, plus particulièrement les IgG obtenus selon le procédé de sélection, les fragments (Fab')₂ ou (Fab'), ou tout polypeptide
5 correspondant au site des anticorps ou fragments d'anticorps impliqués dans le transport des molécules.

Dans le procédé de préparation d'un produit de couplage selon l'invention, il est fait en sorte qu'à chaque immunovecteur est couplée au moins une molécule de produit biologiquement actif, ladite molécule étant liée à
10 l'immunovecteur de préférence de façon covalente.

Les exemples qui suivent illustrent des conditions dans lesquelles, des haptènes comme la fluorescéine et la biotine, des petites molécules comme des hormones, des protéines notamment des enzymes, des
15 inhibiteurs ou activateurs d'enzymes et des médicaments, par exemple des antiviraux tels que l'acyclovir ou l'AZT, peuvent être activement transportées à travers le cytoplasme des cellules traitées et transférées dans le noyau desdites cellules. En particulier, la fluorescéine a été couplée aux groupements aminés libres des immunovecteurs par
20 l'intermédiaire d'un groupement actif isothiocyanate et la biotine par l'intermédiaire d'un ester succinimide actif. Le couplage des haptènes ou autres à l'immunovecteur peut être effectué par l'intermédiaire d'autres réactifs ou groupes de pontage homo- ou hétérobifonctionnels connus dans la littérature comme les imidoesters et N-hydroxy succinimydil esters
25 pouvant réagir avec les groupements aminés, par exemple des dérivés de groupes alkyle, haloaryle, haloacetyl et pyridyl disulfure réagissant préférentiellement maléimides, ou par l'intermédiaire de avec des groupements sulfhydryle, des carbodiimides, ainsi que des molécules portant des groupements photoactivables comme l'azidobenzoyl hydrazide
30 (13).

En outre, les inventeurs ont préparé des produits de couplage où l'immunovecteur est un anticorps bi-spécifique contre un antigène cible, construit, soit par voie chimique soit par voie du génie génétique, et ont parallèlement immunisé des individus, par exemple des souris avec lesdits
5 antigènes cibles, et sélectionné des immunovecteurs anticorps bi-spécifiques réagissant préférentiellement avec lesdits antigènes cibles, de sorte que l'action des immunovecteurs soit spécifiquement dirigée.

Des techniques relatives à la synthèse d'anticorps bi-spécifiques ont été
10 notamment décrites par Porstmann et al en 1984 (16), une étude intitulée "Development of a bispecific monoclonal antibody for use in molecular hybridisation" ayant été par ailleurs publiée en 1994 par Auriol et al (17).

De manière avantageuse, les anticorps bi-spécifiques utilisés dans ce
15 procédé reconnaissent entre autres les protéines Tat, Rev du rétrovirus VIH, ainsi que des marqueurs de surface, CD3, CD4, CD8, CD19, et CD34.

Par ailleurs, la présente invention concerne un procédé de transfert d'un principe actif dans les noyaux de cellules eucaryotes choisies, caractérisé
20 par le couplage de ce principe actif à un immunovecteur possédant à la fois la capacité à permettre l'internalisation de ce principe actif dans ces cellules eucaryotes et une affinité pour l'ADN de ces cellules, au point de le rendre apte à transporter ce principe biologiquement actif à proximité immédiate ou dans les noyaux de ces cellules.

25 Ce principe biologiquement actif peut être couplé de façon covalente ou non covalente à l'immunovecteur.

Préférentiellement, ce procédé de transfert est caractérisé en ce que
30 l'immunovecteur entrant dans la constitution de ce produit est choisi parmi ceux qui sont sélectionnables par un test de pénétration cellulaire

- comportant une première incubation de l'immunovecteur étudié en présence de cellules dans le noyau desquelles le principe actif susceptible d'être associé à l'immunovecteur doit être transporté, suivie après fixation et perméabilisation de ces cellules, d'une autre incubation avec des anticorps anti-immunovecteurs marqués, et enfin la détection à proximité immédiate du noyau ou même au sein de celui-ci de la réaction immunologique du type antigène-anticorps entre l'immunovecteur et l'anticorps anti-immunovecteur.
- 5
- 10 Dans une réalisation préférée du procédé de transfert selon l'invention, l'immunovecteur utilisé est formé d'un anticorps ayant une affinité pour un acide nucléique, ou d'un fragment de cet anticorps conservant cette affinité.
- 15 Cet immunovecteur utilisé dans ce procédé est préférentiellement choisi parmi les anticorps, de préférence des IgG monoclonales, les fragments (Fab')₂ ou (Fab'), ou tous polypeptides correspondant au(x) site(s) des anticorps impliqué(s) dans la reconnaissance de l'acide nucléique correspondant.
- 20
- Avantageusement, une fois le produit de couplage immunovecteur/principe actif préparé, il peut être utilisé pour le transfert intranucléaire d'autres molécules. Ainsi, au conjugué fluorescéine/immunovecteur expérimenté, on peut associer un anticorps anti-fluorescéine couplé avec une molécule tierce, et ainsi transférer ladite molécule tierce dans les noyaux des cellules. De façon similaire, le conjugué biotine/immunovecteur peut permettre la liaison d'un anticorps anti-biotine ou d'avidine-streptavidine couplé avec une molécule tierce à transférer dans les noyaux.
- 25
- 30 Dans la présente invention, on a transféré dans le noyau une enzyme telle que la peroxydase de raifort, mais d'autres protéines possédant des

activités biologiques variées peuvent aussi être utilisées. On a aussi utilisé la peroxydase couplée à l'immunovecteur par l'intermédiaire du glutaraldéhyde. Cependant, d'autres procédés connus dans la littérature, comme ceux décrits dans le cas des haptènes, peuvent être aussi utilisés.

5

Comme dans le cas des conjugués haptènes/immunovecteur, il peut être utilisé, en association avec les conjugués protéine/immunovecteurs, un anticorps anti-protéine couplé avec une molécule tierce pour le transfert intranucléaire de ladite molécule.

10

Dans l'invention ici décrite, bien qu'on ait transféré un polynucléotide dans le noyau, une très grande variété d'acides nucléiques possédant des activités biologiques appropriées peut être également activement transférée au niveau intranucléaire.

15

Ainsi un procédé de transfert de principes actifs selon l'invention permet notamment le transfert de gènes destinés à s'intégrer dans le génome des cellules cibles, notamment par recombinaison homologue plus particulièrement le transfert d'ADN "nu", ce dernier pouvant être

20

notamment utilisé en tant qu'"ADN vaccin".

Une des techniques de recombinaison homologue possible est celle décrite par le Mouellic et al. en 1990 (18).

25

De récents travaux effectués par Whalen R. G. et al ont permis de montrer l'existence d'une réponse immunitaire suite à un transfert d'ADN. Ces travaux qui ont fait l'objet de la demande de brevet WO 95/11307, ont été plus particulièrement appliqués à l'expression de molécules monoclonales du type cytokine IL2 (19).

30

En outre, ce procédé de transfert permet d'introduire des séquences nucléotidiques impliquées dans l'immortalisation de différents types cellulaires, particulièrement les macrophages, les cellules dendritiques, les cellules B et T, et les cellules hématopoïétiques notamment d'origine humaine. A titre de séquences nucléotidiques on peut citer les séquences oncogènes ou des séquences virales associées à des phénomènes de transformation cellulaire.

Il permet également le transfert d'oligonucléotides antisens permettant l'inhibition de la synthèse protéique ou nucléotidique, par exemple dans les cellules infectables par un rétrovirus tel que VIH, ou les cellules tumorales.

Dans la présente invention, le polynucléotide a été couplé à l'immunovecteur par l'intermédiaire de la p-benzoquinone. Cependant, d'autres procédés connus dans la littérature peuvent être aussi employés.

Par ailleurs, la présente invention est aussi relative aux cellules eucaryotes contenant des molécules actives de préférence au niveau nucléaire, caractérisées en ce que lesdites molécules ne sont pas naturellement incorporables aux noyaux desdites cellules, ou ont un taux d'expression faible dans lesdites cellules. Ces molécules sont présentées dans ces cellules à proximité immédiate de leurs noyaux ou dans ceux-ci, et couplées à un immunovecteur caractérisé par son affinité pour l'ADN de ces cellules, à l'état de produit de couplage selon l'invention.

Parmi les cellules visées par la présente invention, on retrouve notamment les cellules infectables par un virus ou les cellules tumorales.

Entrent également dans le cadre de la présente invention les hybridomes produisant les anticorps selon la présente invention, tels que déposés à la CNCM le 30 juin 1995 sous les numéros I-1605, I-1606, I-1607.

En outre, l'invention est relative à une composition pharmaceutique caractérisée en ce qu'elle contient, en association avec un véhicule physiologiquement acceptable, un produit de couplage selon l'invention, dans lequel le principe biologiquement actif est un principe actif de médicament ou de vaccin et l'immunovecteur est compatible avec l'organisme de l'hôte auquel le médicament est destiné.

Entre également dans le cadre de la présente invention, l'utilisation du produit de couplage de l'invention pour l'expression dans des cellules réceptrices d'une séquence nucléotidique hétérologue par rapport à l'ADN de l'hôte.

EXEMPLES

I. PREPARATION D'IMMUNOVECTEURS

A) Immunovecteurs polyclonaux

Les IgG humaines ou murines sont d'abord isolées par passage d'un mélange de sérums provenant d'individus atteints de lupus érythémateux disséminé - ou de souris lupiques (NZB x NZW)F1 - sur de la protéine A immobilisé sur Sepharose (14).

Les IgG isolées sont passées sur une colonne d'ADN immobilisé sur de la cellulose. Les anticorps spécifiques anti-ADN présents dans ces IgG sont fixés sur cet immunoadsorbant ADN-cellulose et élués avec un tampon carbonate bicarbonate de sodium 20 μ M, pH 10, contenant 5 % de diméthylsulfoxyde (15). On isole ainsi 1 à 2 mg d'anticorps à partir de 10 mg d'IgG. Les anticorps élués sont dialysés, concentrés et conservés à +4°C jusqu'à leur utilisation.

B) Immunovecteurs monoclonaux murins

Les splénocytes provenant de souris lupiques (NZB x NZW)F1 sont
5 fusionnés avec le myélome X63 selon le procédé de Köhler et Milstein. Les
hybridomes produits sont testés en ELISA pour la sécrétion d'IgG et pour
leur activité anti-ADN. Les hybridomes sécréteurs d'IgG anti-ADN sont
sous-clonés au moins deux fois et les clones demeurés doublement
10 positifs (IgG + anti-ADN) sont cultivés en masse ou bien des ascites sont
préparés à partir de ces clones chez la souris. Dans une expérience
typique à partir de la rate d'une souris (NZB x NZW)F1, on a obtenu
approximativement 300 puits positifs sécrétant des IgG dont 60 étaient
capables de réagir avec l'ADN. Après clonage, 20 clones sécrétaient de
15 l'IgG reconnaissant l'ADN. De ces 20 clones, approximativement la moitié
sécrétaient des anticorps capables de pénétrer dans le noyau des cellules
alors que les autres n'en étaient pas capables (voir C : test de pénétration
intranucléaire des immunovecteurs). Les IgG monoclonales sont isolées à
partir des surnageants de culture ou des liquides d'ascites par précipitation
20 avec du sulfate d'ammonium à 45% suivi, après dialyse, par passage sur
de la protéine A immobilisé sur Sepharose. Après neutralisation des IgG
éluées, les préparations sont dialysées, concentrées et gardées à -20°C
jusqu'à leur utilisation.

Les anticorps de souris ci-dessus évoqués seront subséquemment
25 humanisés par l'utilisation d'une des techniques connues, par exemple
celle décrite par Riechmann et al. (20).

C) Sélection des immunovecteurs

30 1) Test de pénétration intranucléaire des immunovecteurs

Deux lignées de fibroblastes - PtK2 provenant de rein de rat kangourou et GMA-32 provenant de rein de hamster - ont été principalement utilisées. Les lames portant les fibroblastes en croissance exponentielle ensemencées à 2×10^4 cellules/ml, 24 heures auparavant et mises en culture dans du milieu RPMI 1640 ou MEM (contenant 10 % du sérum de veau foetal, 2mM-L-glutamine et 1 % de pyruvate de sodium) sont incubées à 37°C dans du milieu de culture renouvelé, contenant des quantités choisies d'immunovecteur (1 à 70 µg/ml). Après 2 à 4 heures d'incubation, les cellules sont lavées avec du PBS et fixées avec soit de l'éthanol pendant 10 minutes à -20°C, soit avec 0.2 % de glutaraldehyde et 2 % de formaldéhyde dans du PBS pendant 20 minutes. Après trois lavages avec du PBS, les cellules sont perméabilisées pendant 20 minutes dans du PBS contenant 0.2 % de sérum albumine bovine et 0.5 % de saponine.

15

Les préparations cellulaires sont alors lavées avec du PBS et incubées pendant 45 minutes à 24°C avec des anticorps de lapin ou de mouton anti-immunoglobulines de souris (ou anti-immunoglobulines humaines) marqués avec la fluorescéine ou avec la peroxydase (20 µg/ml). Après lavage, les préparations cellulaires incubées avec l'anticorps fluorescent sont examinées au microscope à fluorescence. Les préparations cellulaires incubées avec l'anticorps marqué avec la peroxydase sont d'abord incubées dans le substrat cytochimique de la peroxydase (diaminobenzidine (DAB) + H_2O_2) et, après lavage, la préparation est examinée au microscope optique (14). Le nombre de cellules positives est compté.

Tel que précédemment décrit, des thymocytes de souris ont été aussi utilisés pour tester la pénétration des immunovecteurs dans le noyau. Des suspensions de thymocytes ont été préparées à partir de thymus de souris BALB/c. Les thymocytes, à une concentration de 1×10^6 cellules/ml, sont

30

incubées à 37°C pendant 3 heures dans un milieu de culture contenant des quantités croissantes d'immunovecteur (1 à 70 µg/ml). Après lavage et fixation, les lymphocytes sont traités comme les préparations de fibroblastes ci-dessus pour la détection intranucléaire des anticorps.

5

2) Test de fixation des anticorps anti-DNA sur les cellules lymphoïdes

De façon à mettre en évidence une réaction avec les membranes des
10 cellules, 10⁶ thymocytes ou splénocytes de souris ont été incubés à froid pendant 45 minutes avec 0,1 ml des différents anticorps monoclonaux dilués dans une solution d'albumine bovine à 0,1 % contenant 0,2 % d'azide de sodium. Après lavage, les cellules sont incubées avec des anticorps anti-IgG de souris fluorescent pendant 45 minutes à froid. Après
15 lavage, les cellules sont examinées au FACS et le nombre de cellules positives déterminé dans chaque population.

Des 20 anticorps monoclonaux examinés, approximativement la moitié sécrètent des anticorps qui sont capables de pénétrer dans le noyau des
20 cellules alors que l'autre moitié n'en est pas capable. Une corrélation a pu être établie entre les anticorps monoclonaux pénétrant avec une grande efficacité dans le noyau des cellules (nombre de cellules marquées, dilution limite pour obtenir un marquage) et leur aptitude à marquer les thymocytes et les splénocytes.

25

II PREPARATION D'IMMUNOVECTEURS PORTANT DES HAPTENES, PROTEINES OU ACIDES NUCLEIQUES

A) Préparation de fragments F(ab')₂ et Fab' d'immunovecteurs

30

Les fragments F(ab')₂ des immunovecteurs sont préparés selon des procédés décrits impliquant une protéolyse par la pepsine suivie d'une réduction par la cystéine pour obtenir le fragment Fab' (14). Ainsi dans 5 ml de tampon citrate-acide citrique 0,1M, pH 3,5, contenant 5 mg d'immunovecteur, on ajoute 150 µg de pepsine et on incube 2 heures à 37°C. Le milieu est ajusté à pH 8 et la préparation filtrée sur une colonne de protéine A-Sepharose pour éliminer les IgG non digérées. Après dialyse contre du PBS, cette préparation de F(ab')₂ est conservée à -20°C jusqu'à utilisation. Pour obtenir les fragments Fab' on ajoute de la cystéine à une concentration finale de 0.02 M dans la préparation du F(ab')₂. Après 10 minutes d'incubation à 37°C, on ajoute 0.04 M d'iodoacétamide et on laisse incuber pendant 30 minutes. Cette préparation de Fab' est dialysée contre du PBS et est conservée à -20°C jusqu'à son utilisation.

B) Immunovecteurs/haptènes

Couplage à la biotine

Dans 0,5 ml de tampon phosphate 0,1M, pH7, contenant 1 mg d'anticorps, on ajoute 2 µl d'une solution 0.1M de d-biotine-N-hydroxysuccinimide ester dans du diméthylformamide (1 mg de l'ester actif dans 30 µl de diméthylformamide). On laisse la solution pendant 1 heure à la température du laboratoire et on dialyse contre du PBS à +4°C toute la nuit.

25

Couplage à la fluorescéine

Dans 1 ml d'une solution de carbonate de sodium 0.1M contenant 1 mg d'anticorps, on ajoute 20 µl d'une solution d'isothiocyanate de fluorescéine dans le diméthylsulfoxyde (10 mg/ml). On laisse la solution 3 heures à la température du laboratoire et on dialyse contre du PBS à +4°C.

C) Immunovecteurs/protéinesCouplage avec la peroxydase

5

Dix milligrammes de peroxydase sont dissous dans 0.2 ml de glutaraldehyde à 1 % dans du tampon phosphate 0.1M pH 6,8. Après incubation à la température du laboratoire pendant 18 heures, la solution est filtrée sur une colonne de Sephadex G25 (0,9 x 60 cm) équilibrée avec NaCl 0.15M pour éliminer l'excès de glutaraldehyde. A cette solution de peroxydase activée, on ajoute 1 ml d'une solution de NaCl 0.15 M contenant 5 mg d'anticorps et 0,2 ml de tampon carbonate-bicarbonate 1M pH 9.5. La solution est gardée à +4°C pendant 24 heures puis additionnée de lysine à la concentration finale de 0.1 M, puis dialysée contre PBS à 4°C.

15

D) Immunovecteurs/acides nucléiquesPolynucléotides

20

Le polynucléotide utilisé était composé de 15 nucléotides et portait une fluorescéine en 5' et un groupement NH₂ libre en 3'. Il a été préparé selon des procédés classiques de synthèse nucléique. Ce nucléotide a été couplé à l'immunovecteur par l'intermédiaire de la p-benzoquinone (14). Dans 0,4 ml de tampon phosphate 0.1 M pH 6 contenant 1 mg d'immunovecteur (molécule entière, F(ab')₂ ou Fab') on ajoute 0,1 ml d'éthanol contenant 3 mg de p-benzoquinone. Après une incubation d'une heure à la température du laboratoire la préparation est filtrée sur colonne de Sephadex G-25. La fraction contenant l'immunovecteur activé est additionnée du polynucléotide dans un rapport d'une molécule d'immunovecteur pour 4 molécules de polynucléotide, et la solution

30

ramenée à pH 9.2 avec du tampon carbonate-bicarbonate. Après 18 heures d'incubation à la température du laboratoire, la réaction est arrêtée par addition de lysine à la concentration de 0.1M finale et ensuite dialysée contre du PBS. Cette préparation est conservée à +4°C jusqu'à son utilisation.

Plasmides

Deux plasmides ont été testés, un premier portant le promoteur de la vimentine en amont du gène codant pour les antigènes T, t du SV40 (pHuVim 830 T,t) (21) et un deuxième portant le gène de la luciférase (22) sous le contrôle d'un promoteur du cytomegalovirus (pCMV-Luc) (5).

Ces plasmides sont maintenus dans la souche E. coli et sont préparés après une culture bactérienne par la méthode standard de lyse en présence de détergent et en milieu alcalin. Les plasmides sont ensuite purifiés par chromatographie sur une colonne de résine (Qiagen Plasmid Kits).

Les immunovecteurs J-20.8 et F-14.6 sont utilisés pour ce travail. Ces anticorps sont préparés par la méthode de préparation d'immunovecteurs monoclonaux précédemment décrite au paragraphe I.B/. Les anticorps sont couplés à de la poly-L-lysine à l'aide d'un agent de couplage, particulièrement un carbodiimide, tel l'EDC (1-(3-diméthylaminopropyl)-1'-ethyl carbodiimide). Dans certains cas, des IgG polyclonales sont ajoutées à l'anticorps anti-ADN dans un rapport 10 : 1 de façon à augmenter la concentration d'IgG dans le milieu et favoriser ainsi le couplage avec la polylysine.

- 2 mg d'anticorps monoclonal (J-20.8 ou F-14.6) dans 1 ml de PBS ou d'IgG polyclonales concentrées à 20 mg/ml sont dialysés toute la nuit contre un tampon MES, 10 mM, pH 5. Deux mg de poly-L-lysine (PM =

18.000) sont dissous dans 1 ml de ce même tampon puis additionnés de 0,2 mg de EDC (dans 50 µl de tampon MES) pendant 30 secondes. La solution de poly-L-lysine est alors ajoutée à la mixture anticorps/EDC et l'incubation se poursuit pendant 2 heures.

- 5 - la préparation est ensuite filtrée sur une colonne protéine A-Sépharose pour séparer l'excès de poly-L-lysine des anticorps conjugués à la polylysine qui sont élués à pH 3 dans les conditions habituelles, neutralisés et dialysés contre du PBS.

10

III. EXEMPLES DE TRANSFERT DE SUBSTANCES DANS LES NOYAUX DES CELLULES PAR DES IMMUNOVECTEURS ASSOCIES A CES SUBSTANCES

15 A) Transfert in vitro de la fluorescéine

Des fibroblastes de la lignée GM A-32 en culture sur des lamelles de verre sont incubés à 37°C pendant 2 à 4 heures dans du milieu de culture RPMI contenant des quantités croissantes d'immunovecteurs monoclonaux (anticorps J-20.8 ou fragments Fab'2) marqués avec la fluorescéine. Au
20 bout de ce temps, les cellules sont lavées et fixées comme décrit dans IC1. Après inclusion dans le milieu Mowiol, elles sont examinées au microscope en fluorescence. La presque totalité des noyaux des fibroblastes montre un marquage fluorescent. Par contre, les noyaux de fibroblastes incubés avec
25 un anticorps monoclonal témoin Ig 2a sans activité anti-ADN, qui ne pénètre pas dans les noyaux, ne présentent pas de fluorescence (Figures 1 et 2).

30 B) Transfert in vivo de la fluorescéine dans les lymphocytes périphériques de la souris

Un mg d'immunovecteur (anticorps monoclonal C-2.1 ou F-4.1 ou d'anticorps témoin (anticorps monoclonal G-14) marqué avec la fluorescéine est injecté à deux souris à raison de 0,2 ml par voie intraveineuse et 0,3 ml par voie intrapéritonéale. Après 5 heures les souris
5 sont saignées et sacrifiées et les lymphocytes du sang circulant sont analysés par FACS. On note que 60% des lymphocytes du sang périphérique provenant de la souris injectée avec l'immunovecteur sont fluorescents alors qu'aucun des lymphocytes de l'animal témoin ne le sont (Figure 3). L'examen au microscope montre une fluorescence au niveau
10 des noyaux dans la majorité des cellules.

C) Transfert de la biotine

Des fibroblastes de la lignée PtK2 (10^5 /ml) mis en culture 24 heures
15 auparavant sont incubés dans un milieu de culture RPMI complet avec des IgG polyclonales anti-DNA humaines marquées avec la biotine en quantités croissantes (5-100 μ g). Après 3 heures, les cellules sont lavées, fixées et perméabilisées comme décrit dans IC. Les cellules sont ensuite incubées avec du RPMI contenant 1 μ g/ml de streptavidine marquée à la
20 peroxydase. Après une heure, les cellules sont lavées trois fois avec du PBS et la peroxydase associée aux cellules est révélée en utilisant le milieu DAB + H_2O_2 . Les préparations sont incluses dans du Mowiol et examinées au microscope optique. Un grand nombre de noyaux des fibroblastes incubés avec l'IgG anti-ADN sont positifs alors que les cellules
25 incubées avec des IgG provenant d'individus normaux et marquées avec la biotine, sont négatives.

D) Transfert de la peroxydase

30 Dans les conditions définies en paragraphe IIIC, les fibroblastes PtK2 sont incubés avec des quantités croissantes de fragments Fab' d'un

immunovecteur (anticorps J-20.8) marqué avec la peroxydase. Après 3 heures, les cellules sont lavées trois fois avec du PBS et fixées pendant 20 minutes avec 0.2 % de glutaraldehyde et 2 % de formaldéhyde dans du PBS. Après lavage, on révèle l'activité de la peroxydase par le test coloré
5 DAB + H₂O₂ et on examine les préparations au microscope optique. Une grande proportion de noyaux des fibroblastes incubés avec les fragments Fab' de l'anticorps J-20.8 sont positifs pour la peroxydase, alors que ceux incubés avec l'anticorps contrôle 48.9 sont négatifs.

10 E) Transfert de polynucléotide marqué à la fluorescéine

3 x 10⁶ splénocytes, préparés à partir de la rate de souris BALB/c, sont incubés dans 1 ml de RPMI contenant 40 µg/ml d'immunovecteur (J-20.8) ou de son fragment Fab' couplé de manière covalente au polynucléotide.
15 Après trois heures d'incubation à 37°C, les cellules sont lavées avec du PBS, fixées en 4% de paraformaldéhyde et examinées au microscope. Huit à 10 % des cellules montrent une fluorescence intranucléaire (Figure 4).

F) Transfert de plasmide

20

L'efficacité de transfection a été évaluée par la mise en évidence de la synthèse des protéines codées par ces gènes, soit à l'aide d'anticorps anti-antigène T couplés à la peroxydase, soit par un dosage luminométrique de l'activité de la luciférase sur son substrat la luciférine.

25

Les cellules utilisées sont des fibroblastes de la lignée GMA-32 et des cellules de carcinome Hep 2. Elles sont cultivées dans un milieu complet (milieu RPMI 1640 contenant 10% de sérum de veau foetal, 2mM L-glutamine, 1% de pyruvate de sodium et des antibiotiques), à 37°C de 5%
30 de CO₂.

Plasmide pHuVim 830 T,t : Les cellules Hep2 sont ensemencées la veille à raison de 2×10^4 cellules dans 0,5 ml de milieu complet par puits d'une plaque de 24 puits. Pour la transfection, le milieu est retiré et remplacé par 0,3 ml de milieu complet contenant 20 μ g d'anticorps-poly-L-lysine et 2 μ g de plasmide, ou 20 μ g d'anticorps natifs et 2 μ g de plasmide ou 2 μ g de plasmide seul. Après 6 heures, le milieu est changé et la culture est poursuivie en changeant le milieu tous les deux jours et en dédoublant les cellules si nécessaires. L'efficacité de la transfection est testée à des temps variables.

10

Plasmide pCMV-Luc : les cellules GMA-32 sont ensemencées la veille à raison de 7 à 10×10^4 cellules / 0,5 ml de milieu complet par puits d'une plaque de 24 puits de milieu de culture complet. Pour la transfection, le milieu est retiré et remplacé par 0,5 ml de milieu complet contenant 8 μ g de J-20.8/polysine ou de F-14.6/polylysine, ou 20 μ g de J-20.8 IgG polyclonale et 2 μ g de plasmide ou 2 μ g de plasmide seul. Après 6 heures, le milieu est changé. L'efficacité de la transfection est testée 24 heures après le début de la transfection.

20 Contrôle de la transfection

Plasmide pHuVim 830 T,t : la synthèse de l'antigène T dans le noyau des cellules transfectées est mise en évidence par une méthode immunocytochimique. Les cellules sont lavées 3 fois avec du PBS puis 25 fixées 10 minutes dans le méthanol à -20°C . Elles sont ensuite incubées avec l'anticorps anti-antigène T couplé à la peroxydase pendant 1 heure. Après lavage, la peroxydase est révélée par le mélange DAB + H_2O_2 . Dans le puits incubé avec le complexe J-20.8-polylysine et plasmide, des cellules isolées et quelques foyers de cellules ont un noyau fortement 30 coloré en brun après 48 heures et après 2 semaines. Le témoin avec l'anticorps natif ou le plasmide seul est négatif.

Plasmide pCMV-Luc : l'efficacité de la transfection est mise en évidence par la synthèse de luciférase détectable dans les lysats des cellules transfectées. Cette enzyme catalyse l'oxydation de la luciférine qui se traduit par un produit détectable dans un luminomètre. Après la culture, les cellules sont lavées dans le PBS puis lysées dans un tampon Tris-phosphate, 25 mM, pH 7,8, contenant 8 mM MgCl₂, 1 mM DTT, 1% Triton X100, 1% BSA et 15% glycérol. Le lysat est dosé dans un luminomètre par addition automatique d'une solution de luciférine (0,25 mM) et d'ATP (1 mM). Un aliquot du même lysat est dosé quant à sa concentration en protéines par un réactif de Coomassie (Bio-Rad Protein Assay). Les résultats sont exprimés en unités (RLU) par mg de protéines. Comme le montre le tableau, un transfert de gènes a lieu en présence des préparations anticorps J-20.8/polylysine et F-14.6/polylysine alors que les IgG / polylysine n'ont pas d'effet.

L'efficacité de transfection pour un même rapport anticorps/plasmide est 10 fois plus élevée avec la préparation J-20.8 qu'avec le F-14.6. De plus, l'addition d'IgG polyclonales concentrées pendant le couplage à la polylysine semble augmenter l'efficacité de transfection puisque 2 µg de J-20.8 (complexe 20 : 0,5) de la préparation J-20.8-IgG/polylysine donnent des résultats du même ordre de grandeur que 8 µg (complexe 8 : 0,5) de la préparation J-20.8/polylysine.

L'ensemble des résultats obtenus est résumé dans le tableau suivant :

5

Immunovecteur	Rapport anticorps/plasmide $\mu\text{g}/\mu\text{g}$	Dosage $\text{RLU}/\text{mg} \times 10^4$
J-20.8-IgG /polylysine	20 : 0,5 20 : 0,5	5,8 63,00
J-20.8/ polylysine	8 : 2 8 : 1 8 : 1 8 : 0,5	2,00 15,00 38,00 13,00
F-14.6/ polylysine	8 : 0,5	1,3
IgG/polylysine	20 : 0,5 20 : 0,5	< 0,1 < 0,1
Plasmide seul (μg)	2 1 0,5	< 0,1 < 0,1 < 0,1

* * *

Dans ce qui précède, les immunovecteurs préférés étaient essentiellement formés par des anticorps anti-ADN ou des fragments de ces anticorps, sous réserve que ces fragments retiennent le site de reconnaissance pour
5 l'ADN entier. Il va naturellement de soi que les immunovecteurs utilisables dans le cadre de l'invention pourraient être constitués de toute autre façon, dès lors qu'ils permettraient également le transport du principe biologiquement actif qui lui serait associé à travers les membranes de ces cellules et leur cytoplasme et son transfert à proximité du noyau des
10 cellules, ou même à l'intérieur de ce noyau.

A titre d'exemples de tels immunovecteurs, on peut citer des conjugués entre une protéine nucléaire, par exemple un histone, une protéine hnRNP, une polymérase ou un facteur associé à cette polymérase, et le produit
15 actif, cette protéine nucléaire étant elle-même (sauf à ce qu'elle soit à elle seule capable d'assurer l'internalisation et le transfert d'un principe biologiquement actif dans le noyau des cellules) conjuguée à l'anticorps anti-récepteur membranaire de la cellule ou à toute autre molécule permettant l'internalisation dans la cellule du conjugué ainsi produit. Dès
20 lors que ce conjugué est apte à diffuser jusque dans le noyau des cellules et que par ailleurs il pourrait à son tour transporter et transférer, comme cela a été défini plus haut, un principe biologiquement actif qui serait couplé à ce conjugué, il constitue un immunovecteur entrant dans le cadre de la présente invention.

25

Les techniques de sélection qui ont été décrites, plus haut, pour le choix d'immunovecteurs efficaces pour le transfert d'un principe actif dans le noyau des cellules sont tout autant applicables à la sélection des conjugués susmentionnés.

30

- L'homme du métier comprendra qu'un critère de choix supplémentaire pourrait, pour au moins certains des conjugués utilisés, résider dans l'absence d'une intervention indésirable de la protéine nucléaire qu'il contient avec le fonctionnement de la cellule. Il est d'ailleurs à noter que
- 5 seule la partie de la protéine intranucléaire portant son site de reconnaissance de l'ADN correspondant est indispensable à la réalisation conforme à l'invention.

LEGENDE DES FIGURES

FIGURE 1 : Transfert "in vitro" de la fluorescéine.

- Marquage des noyaux des fibroblastes GMA 32 par un immunovecteur marqué à la fluorescéine (anticorps J-20.8) en A et B (grossissement x 100).
- C : Absence de marquage avec l'anticorps contrôle fluorescent (x 100).
- D : Un autre champ vu au faible grossissement (x 40).

10

FIGURE 2 : Même préparation que celle de la Figure 1A analysée en microscope confocale. Les fibroblastes GMA 32 sont marqués essentiellement dans le noyau. Sur la figure 2A, on peut noter une fluorescence totale. La figure 2B correspond à l'analyse de l'intensité de fluorescence.

15

FIGURE 3 : Transfert de la fluorescéine "in vivo.

Analyse au FACS des cellules du sang périphérique des souris injectées 5 heures auparavant sur la figure 3A, l'anticorps contrôle fluorescent et sur la figure 3B avec un immunovecteur fluorescent l'anticorps (J-20.8). Histogrammes représentant en abscisse, l'intensité de fluorescence (en unité arbitraire) et en ordonnée, le nombre de cellules.

20

FIGURE 4 : Analyse des cellules du sang périphérique (de la figure 3) en microscopie confocale. Sur la figure 4A, on peut noter une fluorescence totale. La figure 4B correspond à l'analyse de l'intensité de fluorescence.

25

FIGURE 5 : Transfert "in vitro" d'un nucléotide.

Examen en microscopie confocale d'un splénocyte de souris dans lequel a pénétré le fragment Fab' d'un immunovecteur (anticorps J-20.8) couplé à

30

un nucléotide fluorescent. Sur la figure 5A, on observe une fluorescence totale. La figure 5B correspond à l'analyse de l'intensité de fluorescence.

REFERENCES

- (1) "Non-viral therapy", Current Opinion on Biotechnology, Vol. 5, p. 626-636, (1994), Ledley F.D.
- 5 (2) T.D. McKee, M.E. DeRome, G.Y. WU and M.A. Findeis. Preparation of asioloorosolucoid-polylysine conjugates. Bioconjugate Chem., 5:306 (1994)
- 10 (3) Receptor-mediated endocytosis and nuclear transport of transfecting DNA construct. A.A. Rosenkrank, S.V. Yachmenev, D. A. Jans, N.V. Serebryakova, V.I. Murav'ev, R. Peters and A.S. Sobolev. Exp. Cell Res., 199:323 (1992).
- 15 (4) Receptor-mediated endocytosis of transferrin-polycation conjugates: an efficient way to introduce DNA into hematopoietic cell. M. Zenke, P. Steinlein, E. Wagner, M. Cotte, H. Beug, and M.L. Birnstiel. Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 87:3655 (1990)
- 20 (5) J.R. Merwin, E.P. Carmichael, G.S. Noell, M.E. DeRome, W.L. Thomas, N. Robert, G. Spitalny and H.C. Chiou. CD5-mediated specific delivery of DNA to T lymphocytes: compartmentalization augmented by adenovirus. J. Immunol. Methods, 186:257 (1995).
- 25 (6) E. Wagner, K. Zatloukal, M. Cotten, H. Kirlappos, K. Mechtler, D.T. Curiel and M.L. Birnstiel. Coupling of adenovirus to transferrin-polylysine/DNA complexes enhances receptor-mediated gene delivery and expression of transfected genes. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 89:6099 (1992).

- (7) "Antibody to nuclear ribonucleoprotein penetrates live human mononuclear cells through Fc receptors", *Nature*, Vol. 271 (1978), Donato Alarcon-Segovia et al.
- 5 (8) "Antibody penetration into living cells", *The Journal of Immunology*, Vol. 122, (1979), Donato Alarcon-Segovia et al.
- (9) "V_H gene analysis of spontaneously activated B cells in adult MRL-lpr/lpr mice", *The Journal of Immunology*, Vol. 147, pages 1504-1511,
10 (1991), Mary H. Foster et al.
- (10) "Murine Monoclonal Anti-DBA Antibodies Penetrate Cells, Bind to Nuclei, and Induce Glomerular Proliferation and Proteinuria In Vivo", *J. Am. Soc. Nephrol.*, Vol.2, p.1345-1354 (1992), Demetrios Vlahakos et al.
- 15 (11) "Monoclonal Murine anti-DNA antibody interacts with living mononuclear cells", *Arthritis and Rheumatism*, Vol. 30 No. 6, p. 669-678, (1987), Okudaira et al.
- 20 (12) "Cross-reactions of anti-DNA autoantibodies with cell surface proteins", *Eur. J. Immunol.* Vol. 23, p. 383-390, (1993), Eyal Raz et al.
- (13) "Life Science & Analytical Research Products"; Pierce Interchim
- 25 (14) "Techniques immunoenzymatiques", Editions Inserm, (1987), Ternynck T. and Avrameas S.
- (15) "DNA affinity column chromatography: application in the isolation of distinct antibody populations SLE sera.", *Clin. Exp. Immunol.* Vol. 62, pp.
30 321-328, (1985) Kubota et al.

- (16) "An antibody chimera technique applied to enzyme immunoassay for human alpha-1-fetoprotein with monoclonal and polyclonal antibodies", J. Immunol. Methods, (1984) Vol. 66, p. 179-185, Porstmann B. et al.
- 5 (17) "Development of a bispecific monoclonal antibody for use in molecular hybridization, J. Immunol. Methods, ((1994), Vol. 169, p. 123-133, Auriol J. et al.
- (18) "Targeted replacement of the homeobox gene Hox-3.1 by the
10 Escherichia coli lacZ in mouse chimeric embryos", Genetics, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, (1990), Vol. 87, p. 4712-4716, Le Mouellic et al.
- (19) "DNA-mediated immunization and the energetic immune response to hepatitis B surface antigen", Clin. Immunology and Immunopathology,
15 (1995), Vol. 75, p. 1-12, Whalen R. G. et al.
- (20) "Rehasping human antibodies for therapy", Nature, (1988), Vol. 332, p. 323-327, Riechmann et al.
- 20 (21) B. Schwartz, P. Vicart, C. Delouis and D. Paulin, Mammalian cell lines can be efficiently established *in vitro* upon expression of the SV40 large T antigen driven by a promoter sequence derived from the human vimentin gene. Biol. Cell., 72:7 (1991).
- 25 (22) S.K. Nordeen. Luciferase reporter gene vectors for analysis of promoters and enhancers. Bio Techniques, 6:454 (1988).

REVENDICATIONS

1. Produit de couplage entre un principe biologiquement actif et un immunovecteur ledit produit de couplage étant caractérisé à la fois par la
5 capacité de l'immunovecteur à permettre l'internalisation dans des cellules eucaryotes du principe biologiquement actif, et par l'affinité de l'immunovecteur pour l'ADN de ces cellules, au point de rendre ledit immunovecteur apte à transférer le principe biologiquement actif à proximité immédiate des noyaux de ces cellules ou dans ces noyaux.
10
2. Produit selon la revendication 1, caractérisé en ce que le couplage entre le principe biologiquement actif et l'immunovecteur met en oeuvre une liaison covalente ou non-covalente.
- 15 3. Produit selon la revendication 1 ou la revendication 2, caractérisé en ce que l'immunovecteur entrant dans la constitution de ce produit est choisi parmi ceux qui sont sélectionnables par un test de pénétration cellulaire comportant une première incubation de l'immunovecteur étudié en présence de cellules dans le noyau desquelles le principe actif
20 susceptible d'être associé à l'immunovecteur doit être transféré, suivie, après fixation et perméabilisation de ces cellules, d'une autre incubation avec des anticorps anti-immunovecteurs marqués, et enfin d'une détection à proximité immédiate du noyau ou même au sein de celui-ci de la réaction immunologique du type antigène-anticorps entre l'immunovecteur et
25 l'anticorps anti-immunovecteur.
4. Produit selon l'une quelconque des revendications 1 à 3, caractérisé en ce que l'immunovecteur est formé d'un anticorps ayant une affinité pour un acide nucléique ou un fragment de cet anticorps conservant cette
30 affinité.

5. Produit selon la revendication 4, caractérisé en ce que l'immunovecteur est choisi parmi les IgG monoclonales, les fragments (Fab')₂ ou (Fab'), ou tous polypeptides correspondant au(x) site(s) des anticorps impliqué(s) dans la reconnaissance de l'acide nucléique correspondant.
6. Produit selon la revendication 4 ou 5, caractérisé en ce que les immunovecteurs sont des immunoglobulines, notamment des IgG porteuses d'activité anti-ADN provenant d'individus normaux.
7. Produit selon la revendication 4 ou 5, caractérisé en ce que les immunovecteurs sont des immunoglobulines notamment des IgG porteuses d'activité anti-ADN, provenant d'individus présentant des syndromes auto-immuns, plus particulièrement des syndromes de lupus érythémateux disséminé.
8. Produit selon l'une quelconque des revendications 4 à 7, caractérisé en ce qu'il s'agit d'un anticorps bi-spécifique reconnaissant d'une part l'ADN et d'autre par une protéine telle que Tat, Rev du rétrovirus VIH, et, d'autre part, des marqueurs de surface tels que CD3, CD4, CD8, CD19, et CD34.
9. Produit selon l'une quelconque des revendications 1 à 8, caractérisé en ce que le principe actif couplé à l'immunovecteur est une molécule choisie parmi des acides nucléiques, des protéines ou des haptènes.
10. Produit selon l'une quelconque des revendications 1 à 8, caractérisé en ce que le principe actif couplé à l'immunovecteur est constitué par un

l'expression d'une protéine codée par un gène contenu dans ledit plasmide.

11. Produit selon la revendication 10, caractérisé en ce que lorsque
5 l'immunovecteur est un anticorps ou fragment d'anticorps, ce dernier est préalablement couplé à un agent capable d'induire un effet de compactage sur l'ADN, cet agent étant de préférence le polylysine.
12. Produit selon l'une quelconque des revendications 1 à 8, caractérisé
10 en ce que le principe actif est constitué par un gène destiné à s'intégrer dans le génome des cellules cibles, notamment par recombinaison homologue, plus particulièrement un ADN "nu" contenant une séquence d'acide nucléique codant pour un polypeptide originaire de cellules bactériennes ou eucaryotes, de cellules fongiques, ou de virus, ce
15 polypeptide ayant des propriétés vaccinales.
13. Produit selon l'une quelconque des revendications 1 à 8, caractérisé
en ce que le principe actif permet l'immortalisation de types cellulaires choisis, particulièrement les macrophages, les cellules dendritiques, les
20 cellules B et T, et les cellules hématopoïétiques, notamment d'origine humaine.
14. Produit selon l'une quelconque des revendications 1 à 8, caractérisé
en ce que le principe actif est un oligonucléotide antisens permettant
25 l'inhibition de la synthèse protéique ou nucléotidique, par exemple dans les cellules affectées par un rétrovirus VIH, ou dans des cellules tumorales.
15. Cellules eucaryotes contenant des molécules actives de préférence
au niveau nucléaire, caractérisées en ce que lesdites molécules ne sont
30 pas naturellement incorporables aux noyaux desdites cellules, ou ont un

taux d'expression faible dans lesdites cellules, lesdites molécules étant présentées dans ces cellules à proximité immédiate de leurs noyaux ou dans ceux-ci, et couplées à un immunovecteur caractérisé par son affinité pour l'ADN de ces cellules, à l'état de produit selon l'une quelconque des
5 revendications 1 à 12.

16. Cellules selon la revendication 13, caractérisées en ce qu'il s'agit de cellules infectables par un virus ou de cellules tumorales.

10 17. Hybridomes déposés à la CNCM le 30 juin 1995
sous les numéro d'enregistrement :

I-1605

I-1606

I-1607

15

18. Procédé de transfert in vitro d'un principe actif dans les noyaux de cellules eucaryotes choisies, caractérisé par le couplage de ce principe actif à un immunovecteur possédant à la fois la capacité à permettre l'internalisation de ce principe actif dans ces cellules eucaryotes et une
20 affinité pour l'ADN de ces cellules, au point de le rendre apte à transporter ce principe biologiquement actif à proximité immédiate ou dans les noyaux de ces cellules.

19. Procédé selon la revendication 16, caractérisé en ce que le principe
25 biologiquement actif est couplé de façon covalente ou non covalente à l'immunovecteur.

20. Procédé selon la revendication 16 ou 17, caractérisé en ce que l'immunovecteur entrant dans la constitution de ce produit est choisi parmi
30 ceux qui sont sélectionnables par un test de pénétration cellulaire

- comportant une première incubation de l'immunovecteur étudié en présence de cellules dans le noyau desquelles le principe actif susceptible d'être associé à l'immunovecteur doit être transporté, suivie après fixation et perméabilisation de ces cellules, d'une autre incubation avec des anticorps anti-immunovecteurs marqués, et enfin d'une détection à proximité immédiate du noyau ou même au sein de celui-ci de la réaction immunologique du type antigène-anticorps entre l'immunovecteur et l'anticorps anti-immunovecteur.
- 10 **21.** Procédé selon la revendication 16, caractérisé en ce que l'immunovecteur est formé d'un anticorps ayant une affinité pour un acide nucléique ou un fragment de cet anticorps conservant cette affinité.
- 15 **22.** Procédé selon la revendication 19, caractérisé en ce que l'immunovecteur est choisi parmi les anticorps, de préférence des IgG monoclonales, les fragments (Fab')₂ ou (Fab'), ou tous polypeptides correspondant au(x) site(s) des anticorps impliqué(s) dans la reconnaissance de l'acide nucléique correspondant.
- 20 **23.** Composition pharmaceutique caractérisée en ce qu'elle contient, en association avec un véhicule physiologiquement acceptable, un produit conforme à l'une quelconque des revendications 1 à 9, dans lequel le principe biologiquement actif est un principe actif de médicament ou de vaccin et l'immunovecteur est compatible avec l'organisme de l'hôte auquel
25 le médicament est destiné.
- 24.** Utilisation du produit selon la revendication 1 pour exprimer in vitro dans des cellules réceptrices une séquence nucléotidique hétérologue par rapport à l'ADN de l'hôte.



FIGURE 1A

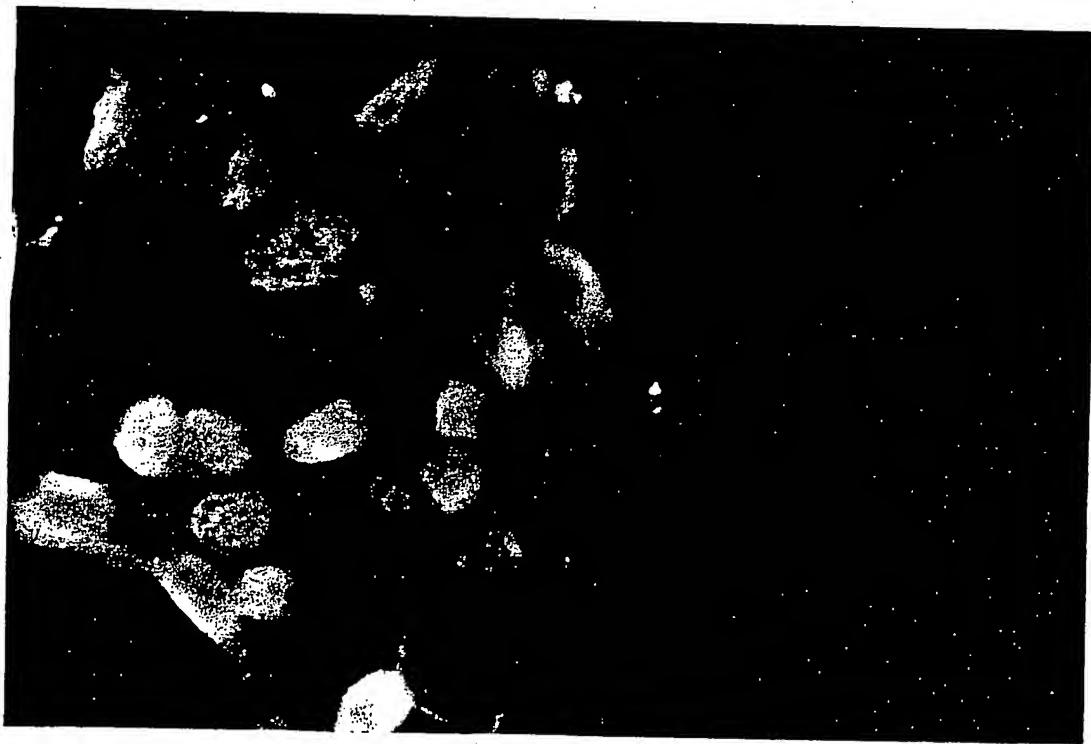


FIGURE 1B

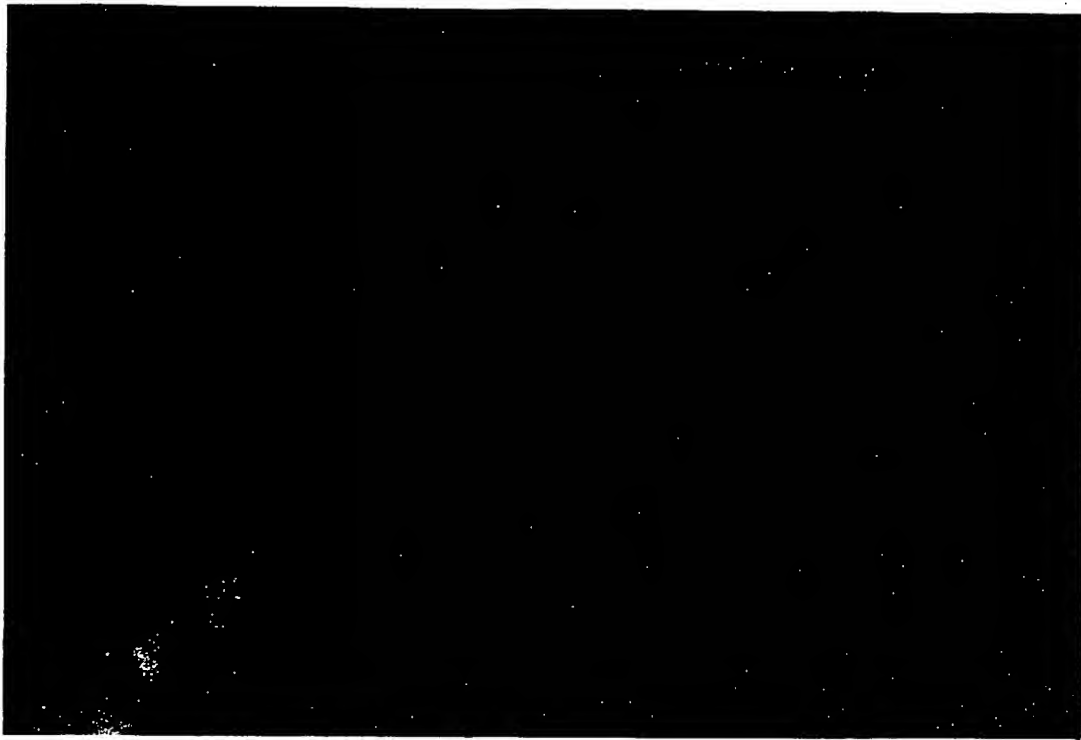


FIGURE 1C

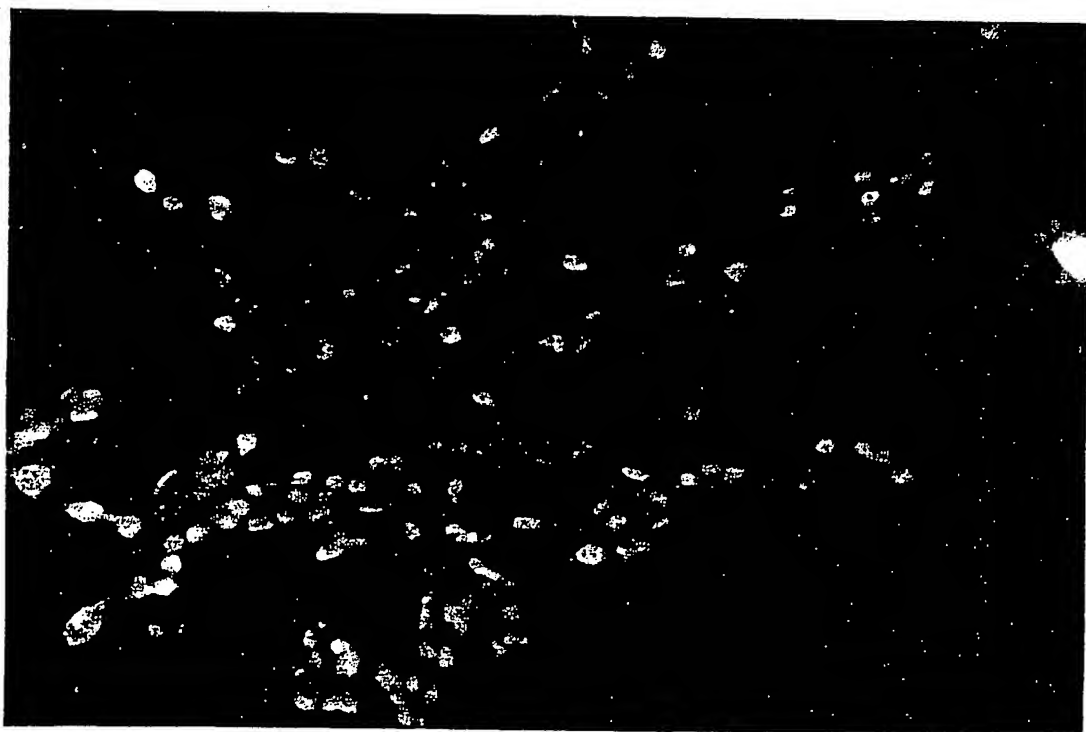


FIGURE 1D

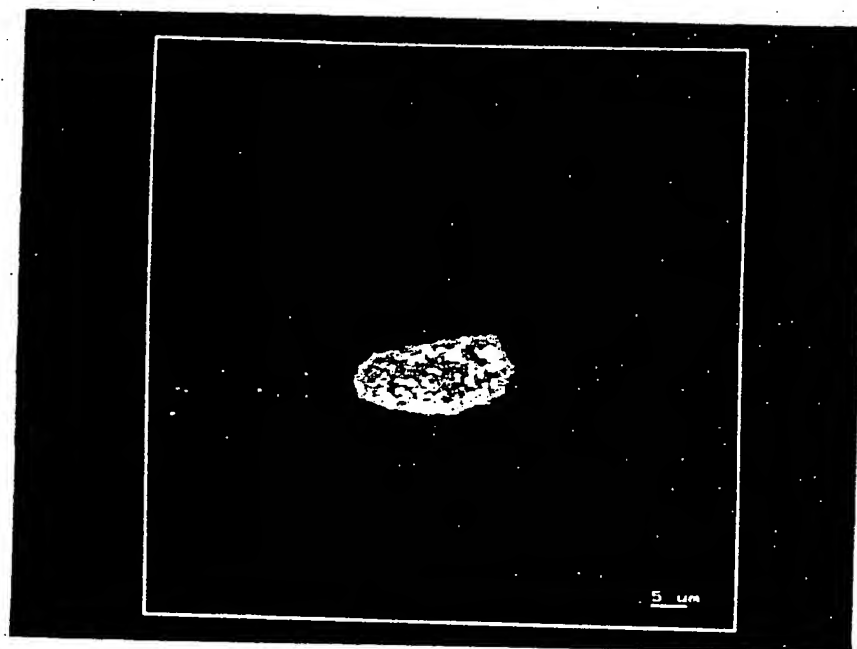


FIGURE 2A



FIGURE 2B

4/6

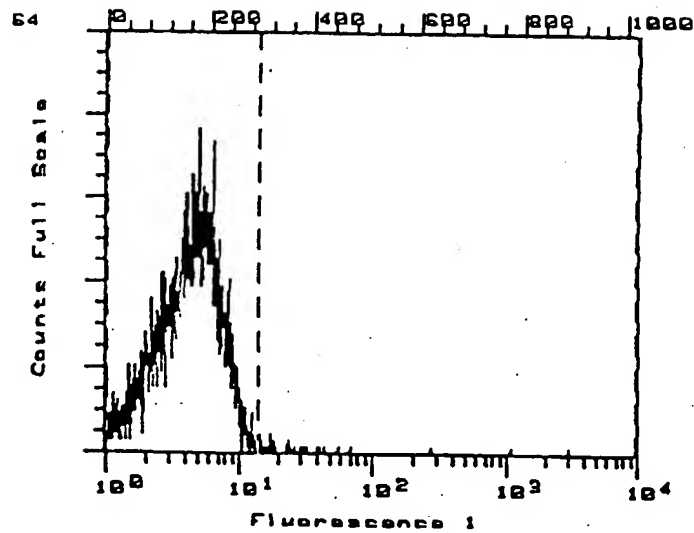


FIGURE 3A

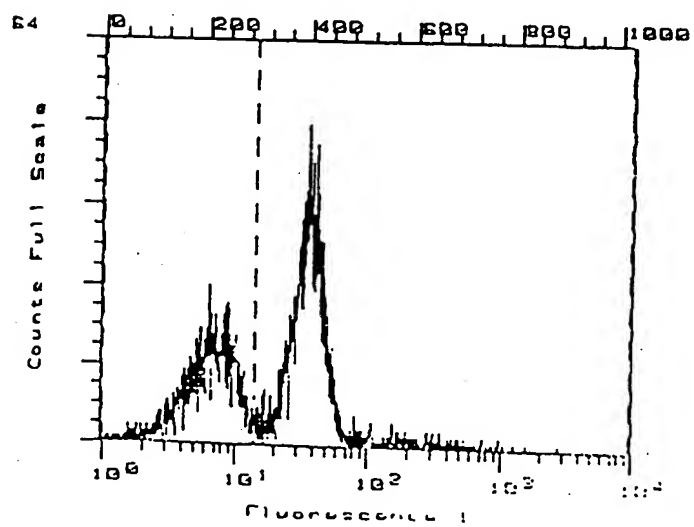


FIGURE 3B

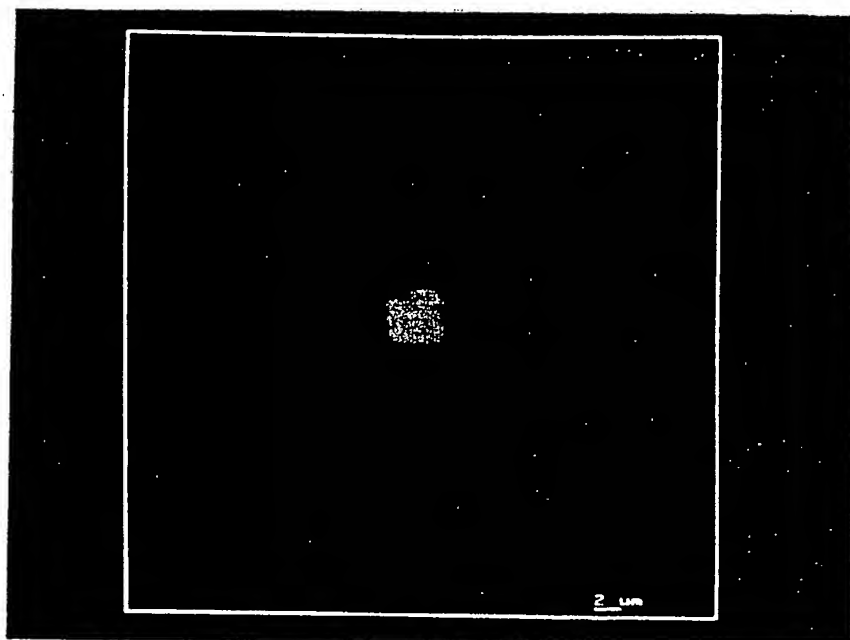


FIGURE 4A

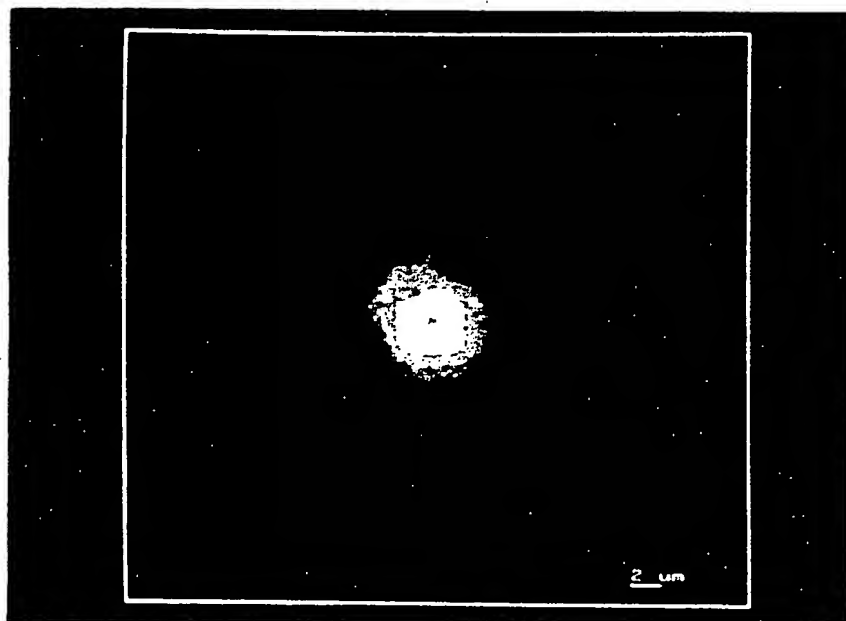


FIGURE 4B

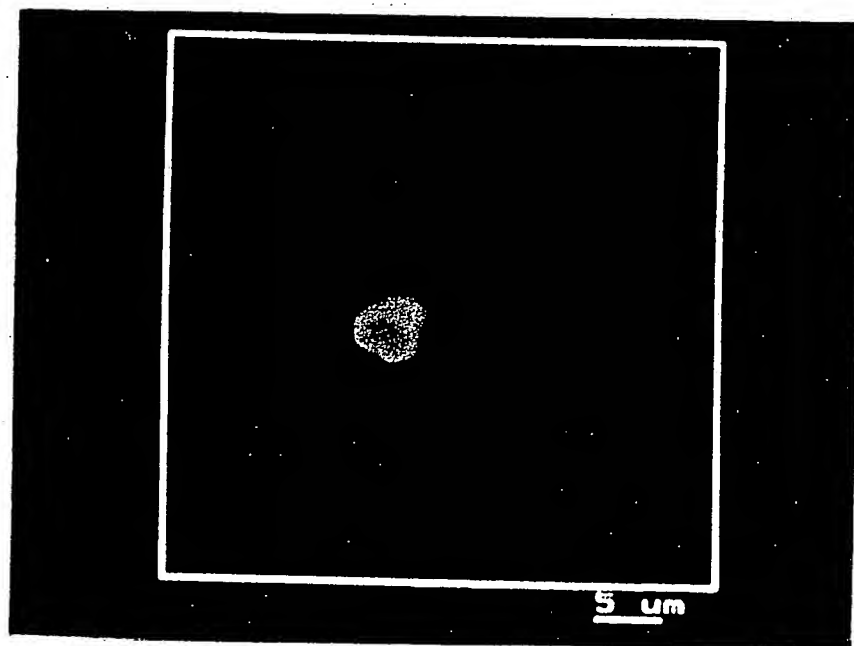


FIGURE 5A

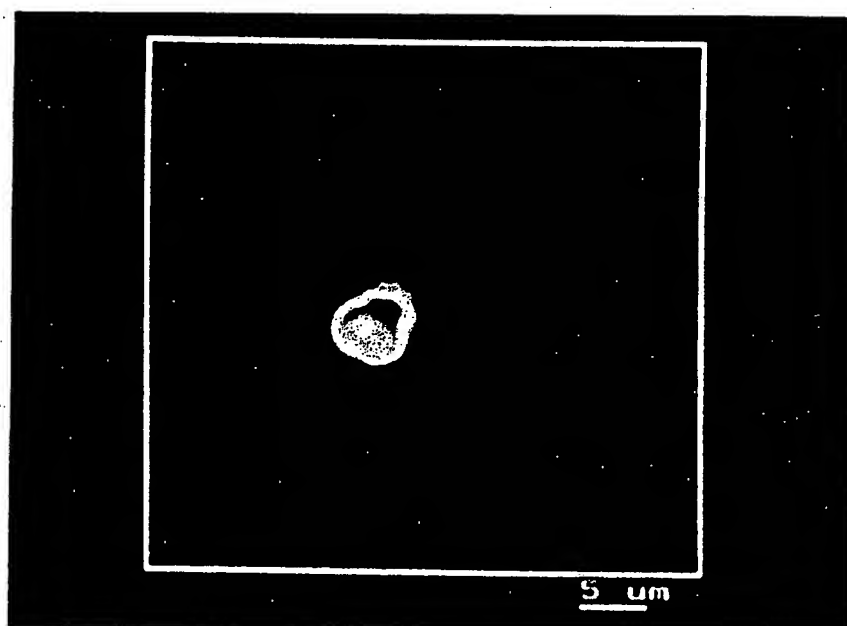


FIGURE 5B

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No

PCT/FR 96/01076

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

IPC 6 A61K47/48

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

IPC 6 A61K

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practical, search terms used)

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	EP 0 468 637 A (LILLY CO ELI) 29 January 1992 see page 4, line 16 - page 6, line 54; claims 1,6,7; example 1 ---	1-24
X	EP 0 511 011 A (SURFACE ACTIVE LIMITED) 28 October 1992 see claims 1,16,17,33 ---	1,2
X	WO 92 13570 A (BOEHRINGER INGELHEIM INT ;GENENTECH INC (US)) 20 August 1992 see claims ---	1,2
A	WO 94 04690 A (GENENTECH INC) 3 March 1994 see page 25, line 10 - line 16 see page 56, line 1 - line 5 --- -/--	1-24

☒ Further documents are listed in the continuation of box C.☒ Patent family members are listed in annex.

* Special categories of cited documents:

- 'A' document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance
- 'E' earlier document but published on or after the international filing date
- 'L' document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)
- 'O' document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means
- 'P' document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

'T' later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention

'X' document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone

'Y' document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art.

'&' document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

16 December 1996

Date of mailing of the international search report

06. 01. 97

Name and mailing address of the ISA

European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2
NL - 2280 HV Rijswijk
Tel. (+ 31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl,
Fax: (+ 31-70) 340-3016

Authorized officer

Berte, M

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No

PCT/FR 96/01076

C.(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	US 4 650 675 A (BOREL YVES ET AL) 17 March 1987 see column 7; claims ---	1-24
Y	NUCLEIC ACIDS RES. (1994), 22(25), 5530-9 CODEN: NARHAD;ISSN: 0305-1048, XP002021247 NIEMEYER, CHRISTOF M. ET AL: "Oligonucleotide-directed self-assembly of proteins: semisynthetic DNA-streptavidin hybrid molecules as connectors for the generation of macroscopic arrays and the construction of supramolecular bioconjugates" see page 5530, column 2; figure 3; table 1 see page 5536, column 1 ---	1-24
A	DATABASE CHEMABS CHEMICAL ABSTRACTS SERVICE, COLUMBUS, OHIO, US AN122:78416, KHAN, SHABBIR A.: "Regulation of human immunodeficiency virus gene expression by the Tat and Rev proteins" XP002021248 see abstract & PEPTIDES (1994), 279-300. EDITOR(S): BASAVA, CHANNA;ANANTHARAMAIAH, GATTADAHALLI NANJUNATH. PUBLISHER: BIRKHAUSER, BOSTON, MASS. CODEN: 60JMAN, -----	1,7,8

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

FR96/01076

Box I Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of item 1 of first sheet)

This international search report has not been established in respect of certain claims under Article 17(2)(a) for the following reasons:

1. ☐ Claims Nos.:
because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:
2. ☒ Claims Nos.: **1-24**
because they relate to parts of the international application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful international search can be carried out, specifically:
Incomplete search. Due to the large number of compounds defined in claims 1-9, the search had to be limited for reasons of economy. The search was confined to the compounds mentioned in the examples and to the relevant search groups of the official documentation.
3. ☐ Claims Nos.:
because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).

Box II Observations where unity of invention is lacking (Continuation of item 2 of first sheet)

This International Searching Authority found multiple inventions in this international application, as follows:

1. ☐ As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers all searchable claims.
2. ☐ As all searchable claims could be searched without effort justifying an additional fee, this Authority did not invite payment of any additional fee.
3. ☐ As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers only those claims for which fees were paid, specifically claims Nos.:
4. ☐ No required additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently, this international search report is restricted to the invention first mentioned in the claims; it is covered by claims Nos.:

Remark on Protest

- ☐ The additional search fees were accompanied by the applicant's protest.
☐ No protest accompanied the payment of additional search fees.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International Application No

PCT/FR 96/01076

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
EP-A-0468637	29-01-92	AU-A- 7915391 CA-A- 2044908 JP-A- 4330018	08-04-93 23-12-91 18-11-92

EP-A-0511011	28-10-92	AP-A- 257 AT-T- 144624 AU-B- 665758 AU-A- 1661892 CN-A- 1069124 DE-D- 69214709 EP-A- 0582595 WO-A- 9219973 HU-A- 66753 JP-T- 6506827 NZ-A- 242510 US-A- 5573920 ZA-A- 9202978	03-06-93 15-11-96 18-01-96 21-12-92 17-02-93 28-11-96 16-02-94 12-11-92 28-12-94 04-08-94 26-08-94 12-11-96 23-06-93

WO-A-9213570	20-08-92	DE-A- 4104186 AT-T- 142890 DE-D- 59207189 EP-A- 0571414 JP-T- 6504993	13-08-92 15-10-96 24-10-96 01-12-93 09-06-94

WO-A-9404690	03-03-94	AU-B- 668423 AU-A- 5080193 CA-A- 2140280 EP-A- 0656064 JP-T- 8500017	02-05-96 15-03-94 03-03-94 07-06-95 09-01-96

US-A-4650675	17-03-87	NONE	

RAPPORT DE RECHERCHE INTERNATIONALE

D ade Internationale No

PCT/FR 96/01076

A. CLASSEMENT DE L'OBJET DE LA DEMANDE

CIB 6 A61K47/48

Selon la classification internationale des brevets (CIB) ou à la fois selon la classification nationale et la CIB

B. DOMAINES SUR LESQUELS LA RECHERCHE A PORTE

Documentation minimale consultée (système de classification suivi des symboles de classement)

CIB 6 A61K

Documentation consultée autre que la documentation minimale dans la mesure où ces documents relèvent des domaines sur lesquels a porté la recherche

Base de données électronique consultée au cours de la recherche internationale (nom de la base de données, et si cela est réalisable, termes de recherche utilisés)

C. DOCUMENTS CONSIDERES COMME PERTINENTS

Catégorie *	Identification des documents cités, avec, le cas échéant, l'indication des passages pertinents	no. des revendications visées
Y	EP 0 468 637 A (LILLY CO ELI) 29 Janvier 1992 voir page 4, ligne 16 - page 6, ligne 54; revendications 1,6,7; exemple 1 ---	1-24
X	EP 0 511 011 A (SURFACE ACTIVE LIMITED) 28 Octobre 1992 voir revendications 1,16,17,33 ---	1,2
X	WO 92 13570 A (BOEHRINGER INGELHEIM INT ;GENENTECH INC (US)) 20 Août 1992 voir revendications ---	1,2
A	WO 94 04690 A (GENENTECH INC) 3 Mars 1994 voir page 25, ligne 10 - ligne 16 voir page 56, ligne 1 - ligne 5 --- -/-	1-24

☒ Voir la suite du cadre C pour la fin de la liste des documents

☒ Les documents de familles de brevets sont indiqués en annexe

* Catégories spéciales de documents cités:

- *A* document définissant l'état général de la technique, non considéré comme particulièrement pertinent
- *E* document antérieur, mais publié à la date de dépôt international ou après cette date
- *L* document pouvant jeter un doute sur une revendication de priorité ou cité pour déterminer la date de publication d'une autre citation ou pour une raison spéciale (telle qu'indiquée)
- *O* document se référant à une divulgation orale, à un usage, à une exposition ou tous autres moyens
- *P* document publié avant la date de dépôt international, mais postérieurement à la date de priorité revendiquée

- *T* document ultérieur publié après la date de dépôt international ou la date de priorité et n'appartenant pas à l'état de la technique pertinent, mais cité pour comprendre le principe ou la théorie constituant la base de l'invention
- *X* document particulièrement pertinent; l'invention revendiquée ne peut être considérée comme nouvelle ou comme impliquant une activité inventive par rapport au document considéré isolément
- *Y* document particulièrement pertinent; l'invention revendiquée ne peut être considérée comme impliquant une activité inventive lorsque le document est associé à un ou plusieurs autres documents de même nature, cette combinaison étant évidente pour une personne du métier
- *&* document qui fait partie de la même famille de brevets

Date à laquelle la recherche internationale a été effectivement achevée

16 Décembre 1996

Date d'expédition du présent rapport de recherche internationale

06.01.97

Nom et adresse postale de l'administration chargée de la recherche internationale
Office Européen des Brevets, P.B. 5818 Patentlaan 2
NL - 2280 HV Rijswijk
Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl,
Fax (+31-70) 340-3016

Fonctionnaire autorisé

Berte, M

C.(suite) DOCUMENTS CONSIDERES COMME PERTINENTS

Catégorie *	Identification des documents cités, avec, le cas échéant, l'indication des passages pertinents	no. des revendications visées
Y	US 4 650 675 A (BOREL YVES ET AL) 17 Mars 1987 voir colonne 7; revendications ---	1-24
Y	NUCLEIC ACIDS RES. (1994), 22(25), 5530-9 CODEN: NARHAD; ISSN: 0305-1048, XP002021247 NIEMEYER, CHRISTOF M. ET AL: "Oligonucleotide-directed self-assembly of proteins: semisynthetic DNA-streptavidin hybrid molecules as connectors for the generation of macroscopic arrays and the construction of supramolecular bioconjugates" voir page 5530, colonne 2; figure 3; tableau 1 voir page 5536, colonne 1 ---	1-24
A	DATABASE CHEMABS CHEMICAL ABSTRACTS SERVICE, COLUMBUS, OHIO, US AN122:78416, KHAN, SHABBIR A.: "Regulation of human immunodeficiency virus gene expression by the Tat and Rev proteins" XP002021248 voir abrégé & PEPTIDES (1994), 279-300. EDITOR(S): BASAVA, CHANNA; ANANTHARAMAIAH, GATTADAHALLI NANJUNATH. PUBLISHER: BIRKHAUSER, BOSTON, MASS. CODEN: 60JMAN, -----	1,7,8

Cadre I Observations - lorsqu'il a été estimé que certaines revendications ne pouvaient pas faire l'objet d'une recherche (suite du point 1 de la première feuille)

Conformément à l'article 17.2)a), certaines revendications n'ont pas fait l'objet d'une recherche pour les motifs suivants:

1. ☐ Les revendications n°
se rapportent à un objet à l'égard duquel l'administration n'est pas tenue de procéder à la recherche, à savoir:
2. ☒ Les revendications n° 1-24
se rapportent à des parties de la demande internationale qui ne remplissent pas suffisamment les conditions prescrites pour qu'une recherche significative puisse être effectuée, en particulier:
Recherches incomplètes. A cause du grand nombre de composés qui sont définis dans les revendications 1,9 la recherche a dû être limitée pour des raisons économiques. La recherche a été restreinte aux composés mentionnés dans les exemples et aux groupes de recherche concernés de la documentation officielle.
3. ☐ Les revendications n°
sont des revendications dépendantes et ne sont pas rédigées conformément aux dispositions de la deuxième et de la troisième phrases de la règle 6.4.a).

Cadre II Observations - lorsqu'il y a absence d'unité de l'invention (suite du point 2 de la première feuille)

L'administration chargée de la recherche internationale a trouvé plusieurs inventions dans la demande internationale, à savoir:

1. ☐ Comme toutes les taxes additionnelles ont été payées dans les délais par le déposant, le présent rapport de recherche internationale porte sur toutes les revendications pouvant faire l'objet d'une recherche.
2. ☐ Comme toutes les recherches portant sur les revendications qui s'y prêtent ont pu être effectuées sans effort particulier justifiant une taxe additionnelle, l'administration n'a sollicité le paiement d'aucune taxe de cette nature.
3. ☐ Comme une partie seulement des taxes additionnelles demandées a été payée dans les délais par le déposant, le présent rapport de recherche internationale ne porte que sur les revendications pour lesquelles les taxes ont été payées, à savoir les revendications n°:
4. ☐ Aucune taxe additionnelle demandée n'a été payée dans les délais par le déposant. En conséquence, le présent rapport de recherche internationale ne porte que sur l'invention mentionnée en premier lieu dans les revendications; elle est couverte par les revendications n°:

Remarque quant à la réserve

- ☐ Les taxes additionnelles étaient accompagnées d'une réserve de la part du déposant.
- ☐ Le paiement des taxes additionnelles n'était assorti d'aucune réserve.

RAPPORT DE RECHERCHE INTERNATIONALE

Renseignements relatifs aux membres de familles de brevets

D nde Internationale No

PCT/FR 96/01076

Document brevet cité au rapport de recherche	Date de publication	Membre(s) de la famille de brevet(s)	Date de publication
EP-A-0468637	29-01-92	AU-A- 7915391	08-04-93
		CA-A- 2044908	23-12-91
		JP-A- 4330018	18-11-92

EP-A-0511011	28-10-92	AP-A- 257	03-06-93
		AT-T- 144624	15-11-96
		AU-B- 665758	18-01-96
		AU-A- 1661892	21-12-92
		CN-A- 1069124	17-02-93
		DE-D- 69214709	28-11-96
		EP-A- 0582595	16-02-94
		WO-A- 9219973	12-11-92
		HU-A- 66753	28-12-94
		JP-T- 6506827	04-08-94
		NZ-A- 242510	26-08-94
		US-A- 5573920	12-11-96
		ZA-A- 9202978	23-06-93

WO-A-9213570	20-08-92	DE-A- 4104186	13-08-92
		AT-T- 142890	15-10-96
		DE-D- 59207189	24-10-96
		EP-A- 0571414	01-12-93
		JP-T- 6504993	09-06-94

WO-A-9404690	03-03-94	AU-B- 668423	02-05-96
		AU-A- 5080193	15-03-94
		CA-A- 2140280	03-03-94
		EP-A- 0656064	07-06-95
		JP-T- 8500017	09-01-96

US-A-4650675	17-03-87	AUCUN	
